

PCT/JP03/02601

Rec'd PCTO 28 SEP 2004 04:03

日本国特許庁 10/509248
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 3月29日

REC'D 25 APR 2003

WIPO

PCT

出願番号

Application Number:

特願2002-097395

[ST.10/C]:

[JP2002-097395]

出願人

Applicant(s):

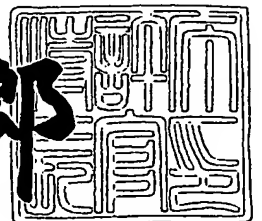
科学技術振興事業団

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 3月14日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3016797

【書類名】 特許願

【整理番号】 P023P02

【提出日】 平成14年 3月29日

【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿

【国際特許分類】 A61K 48/00
A61K 9/51
A61K 47/42
A61P 35/00
A61P 43/00
C07K 14/02
C07K 19/00

【発明の名称】 増殖因子等を提示するタンパク質中空ナノ粒子を用いる
治療薬剤

【特許項の数】 7

【住所又は居所】 大阪府吹田市上山田7番C-104号

【氏名】 黒田 俊一

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府豊能郡豊能町希望ヶ丘2-30-2

【氏名】 谷澤 克行

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市灘区篠原伯母野山町1-2-806

【氏名】 近藤 昭彦

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区納戸町6

【氏名】 上田 政和

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市門田文化町2-10-13

【氏名】 妹尾 昌治

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市豊川 4 - 2 - 1

【氏名】 岩 蒨 秀彦

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100080034

【弁理士】

【氏名又は名称】 原 謙三

【電話番号】 06-6351-4384

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003229

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0111475

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 増殖因子等を提示するタンパク質中空ナノ粒子を用いる治療薬
剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

増殖因子などの特定の細胞表面分子と結合する分子が提示され、粒子形成能を有するタンパク質からなる中空ナノ粒子に、疾患治療用の細胞導入物質が含まれてなる薬剤。

【請求項 2】

上記タンパク質は、改変された B 型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質であることを特徴とする請求項 1 記載の薬剤。

【請求項 3】

上記細胞導入物質は、遺伝子であることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の薬剤。

【請求項 4】

上記遺伝子は、癌治療用の遺伝子であることを特徴とする請求項 3 記載の薬剤

【請求項 5】

上記遺伝子は、単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ (H S V 1 tk) 遺伝子であることを特徴とする請求項 4 記載の薬剤。

【請求項 6】

静脈注射により人体に投与されることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の薬剤を投与することによる疾患の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、増殖因子等を提示するタンパク質中空ナノ粒子を用いた治療薬剤に関し、より詳細には、粒子内部に疾患治療用の細胞導入物質を包含し、この細胞導入物質を特定の細胞または組織内に特異的に導入可能な薬剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

近年、医学の分野において、患部に直接作用し、高い効果を示す副作用の少ない薬品の開発が盛んに行われている。特に、ドラッグデリバリーシステム（DDS）と呼ばれる方法は、目的細胞、あるいは、目的組織に対して特異的に薬剤等の有効成分を運搬し、目的箇所では有効成分を作用させることのできる方法として注目されている。

【0003】

また、最近の分子細胞生物学の分野においても特定細胞への遺伝子導入は必要不可欠な技術として盛んに研究されている。さらに、ヒトゲノム計画の進展により各種疾患の遺伝的な背景が明らかになりつつある現在、このような細胞および組織に対する特異性の高い遺伝子導入法が確立されれば遺伝子治療の分野での応用も可能となる。

【0004】

細胞に遺伝子を導入する方法としては、これまでに、遺伝子を巨大分子化してエンドサイトーシスによって遺伝子を取込ませる方法（リン酸カルシウム法、リポフェクタミン法）や、電気パルス刺激により細胞膜に穿孔を開け、遺伝子を流入させる方法（エレクトロポレーション法、遺伝子銃法）が知られており、いずれも今日では分子生物学的実験において、一般的に実施されている手法である。

【0005】

これらの方法は簡便であるが、細胞を直接、物理的に傷つけ、遺伝子導入部位を外科的に露出させる必要があるため、生体内部の細胞や組織には容易に適用できない。また、100%近い導入率を得ることは難しい。

【0006】

一方、安全性の高い物質導入方法としてはリポソーム法が知られている。この

方法は、細胞を傷つけることがないため、生体内部の細胞や組織にも適用することが可能である。しかし、単純な脂質であるリポソームに高度な細胞および組織特異性を付与することは困難であり、さらに、*in vivo*での遺伝子導入率は、要求される値に比べてはるかに低いという問題がある。

【0007】

最近になって、ウイルスDNAに目的の遺伝子を組み込み、感染性ウイルスを生成して遺伝子導入を行う技術が開発された。この方法は導入部位を露出する必要がなく、個体にも応用でき、導入効率も100%近い画期的な方法として注目されるが、ウイルスが広範囲の細胞に非特異的に感染するため目的の細胞以外にも遺伝子が導入されてしまうという重大な問題がある。また、ウイルスゲノム本体が染色体に組み込まれ、将来予期できぬ副作用を引き起こす可能性があるため、実際には疾病の初期治療等には用いられず、末期の患者に適用されるに留まっているのが現状である。

【0008】

【課題を解決しようとする課題】

以上のような状況に鑑み、本発明者らは、国際公開番号W001/64930の国際出願（以下、「国際出願W001/64930」という）において、粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子が導入された中空ナノ粒子を用いて、目的とする細胞や組織に、物質（遺伝子、タンパク質、化合物等）を特異的かつ安全に運搬、導入するための方法を提案しているが、この方法を用いつつ特定の細胞または組織に対して特異的に作用する治療薬剤の開発等がさらなる課題となっていた。

【0009】

本発明は、上記の課題に鑑みなされたものであり、その目的は、タンパク質中空ナノ粒子を用いた特定の細胞または組織に特異的に作用する疾患治療用薬剤であって、動物実験により実際に治療効果が認められた薬剤、およびこの薬剤を用いる治療方法を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、ヒト扁平上皮癌を移植した実験動物に対して、癌治療用遺伝子を包含し、増殖因子を提示したB型肝炎ウイルス表面抗原粒子を静脈注射することにより、ヒト扁平上皮癌細胞に特異的に癌治療用遺伝子が導入され、移植癌を治療する効果があることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0011】

即ち、本発明に係る薬剤は、増殖因子などの特定の細胞表面分子と結合する分子が提示され、粒子形成能を有するタンパク質からなる中空ナノ粒子に、疾患治療用の細胞導入物質が包含されてなる薬剤である。

【0012】

上記「粒子形成能を有するタンパク質」としては、たとえば本来の肝細胞に対する感染能を欠失するように改変され、さらに増殖因子などを提示するように改変されたB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質を挙げることができる。このタンパク質は、真核細胞で発現させると、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積され、粒子として放出される。こうして得られた中空ナノ粒子は、粒子表面に増殖因子などが提示されているので、特定の細胞に対して特異的に粒子内の物質を運搬することができる。ここで、「特定の細胞」とは、例えば増殖因子に対する受容体などを細胞表面に発現しているため、その増殖因子と結合し、これにより上記中空ナノ粒子内の物質が細胞内に導入される細胞をいう。

【0013】

従って、上記中空ナノ粒子に、疾患治療用の物質（薬剤）を包含させることにより、特定の細胞または組織に対して特異的かつ効果的に作用する有効な治療薬となる。

【0014】

上記「特定の細胞表面分子と結合する分子」としては、上皮成長因子（EGF）等の増殖因子（換言すれば、成長因子）のほかに、インターロイキン、インターフェロン、コロニー刺激因子、腫瘍壊死因子、トランスフォーミング増殖因子 β 、血小板由来増殖因子、エリスロポイエチン、Fas抗原、アクチビン、骨形成因子、神経成長因子などが挙げられる。

【0015】

上記中空ナノ粒子内に包含させる細胞導入物質としては、たとえば癌治療用の遺伝子を挙げることができる。癌治療用遺伝子として、単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ (HSV1 tk) 遺伝子を包含した薬剤を用いる場合は、後述の実施例に示すとおり、別途ガンシクロビルを投与する。

【0016】

本発明の薬剤は、静脈注射という簡便な方法で特定の細胞または組織における疾患を効果的に治療することができ、従来の治療方法と大きく異なり、多量の薬剤の投与あるいは遺伝子治療等における外科手術を必要とせず、副作用の心配も極めて低く、そのまま臨床応用可能なものである。

【0017】

本発明の治療方法は、本発明の薬剤を投与することによる疾患の治療方法である。

【0018】

【発明の実施の形態】

本発明の薬剤を構成する中空ナノ粒子は、粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子（増殖因子などの特定の細胞表面分子と結合する分子）を導入することによって、例えば増殖因子に対する受容体などを発現している目的細胞あるいは目的組織に特異的に物質を運搬することを可能とするものである。このような粒子形成能を有するタンパク質としては、種々のウイルスから得られるサブウイルス粒子を適用することができる。具体的には、B型肝炎ウイルス (Hepatitis B Virus: HBV) 表面抗原タンパク質等が例示される。

【0019】

また、このような粒子形成能を有するタンパク質からなるタンパク質粒子としては、真核細胞でタンパク質を発現させることにより得られるものが挙げられる。つまり、真核細胞で粒子形成能を有するタンパク質を発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積され、粒子として放出されるのである。このとき、真核細胞としては、酵母、昆虫細胞、哺乳細胞等の動物細胞などが適用できる。

【0020】

本発明者らは、後述の実施例に示すとおり、遺伝子組換え酵母で上記HBV表面抗原Lタンパク質を発現させることにより、発現されたHBV表面抗原Lタンパク質から酵母由来の脂質二重膜に多数の同タンパク質が埋め込まれた短径約20nm、長径約150nmの楕円状中空粒子が形成されることを見出し、報告している(J. Biol. Chem., Vol.267, No.3, 1953-1961, 1992)。このような粒子は、HBVゲノムを全く含まないので、ウィルスとしては機能せず、人体への安全性が極めて高い。また、上記HBV表面抗原Lタンパク質を、本来の肝細胞に対する感染能を欠失するように改変し、さらに例えば増殖因子を提示するように改変して発現させた場合は、増殖因子を粒子表面に提示しているため、この増殖因子に対する受容体などを発現する細胞に対して特異的に物質を運搬する運搬体としての効果も高いのである。

【0021】

このように遺伝子組換え酵母を用いてタンパク質粒子を形成する方法は、菌体内の可溶性タンパク質から高効率で粒子が生産される点で好適である。

【0022】

一方、昆虫細胞は、酵母よりも高等動物に近い真核細胞であるといえ、酵母では再現しきれない糖鎖等の高次構造をも再現できる点で異種タンパク質の大量生産において好ましい方法といえる。従来の昆虫細胞の系はバキュロウィルスを用いた系で、ウィルス発現を伴うものであったために、タンパク質発現に際して細胞が死滅したり溶解したりした。その結果、タンパク質発現を連続的行ったり、死滅細胞から遊離したプロテアーゼによりタンパク質が分解したりするという問題があった。また、タンパク質を分泌発現させる場合には、培地中に含まれる大量の牛胎仔血清が混入することで、折角培地中に分泌されても精製が困難であった。しかし、最近になって、バキュロウィルスを介さない昆虫細胞系で、無血清培養可能なものがInvitrogen社により開発され、市販されている。従って、このような昆虫細胞を用いれば、精製が容易で高次構造をも再現されたタンパク質粒子が得られる。

【0023】

本発明のタンパク質中空ナノ粒子では、以上のような種々の方法によって得られた粒子表面に増殖因子などを提示する中空ナノ粒子に対して、種々の物質（DNA、RNA、タンパク質、ペプチド、および薬剤等）を粒子内に導入することにより、その増殖因子に対する受容体などを発現する特定の細胞または組織に極めて高い特異性で物質を運搬、導入することが可能となる。

【0024】

もちろん、粒子形成能を有するタンパク質は、上記の改変されたB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質に限られるものではなく、粒子を形成することができるタンパク質であれば、どのようなものでもよく、動物細胞、植物細胞、ウイルス、菌類等に由来する天然タンパク質や、種々の合成タンパク質等が考慮される。また、例えばウイルス由来の抗原タンパク質等が生体内において抗体を惹起する可能性がある場合などは、改変して抗原性を減少させたものを粒子形成能を有するタンパク質として用いてもよい。例えば、国際出願W001/64930に開示される抗原性を減少させたB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質であってもよいし、国際出願に開示されるその他の改変型タンパク質（B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質を、遺伝子操作技術を用いて改変したタンパク質）であってもよい。

【0025】

粒子表面に提示させる増殖因子などの特定の細胞表面分子と結合する分子としては、たとえば後述の上皮成長因子（EGF）のほかに、インターロイキン、インターフェロン、コロニー刺激因子、腫瘍壊死因子、トランスフォーミング増殖因子β、血小板由来増殖因子、エリスロポイエチン、Fas抗原、アクチビン、骨形成因子、神経成長因子などが好ましく用いられる。これらは、目的とする細胞、あるいは組織に応じて適宜選択される。

【0026】

本発明では、以上のとおりのタンパク質中空ナノ粒子に、目的細胞または組織に導入したい物質（細胞導入物質）を内包させることによって、細胞特異性を有する物質運搬体が得られる。この物質運搬体に内包される細胞導入物質とは、例えばDNA、RNAなどの遺伝子、天然あるいは合成タンパク質、オリゴヌクレ

オチド、ペプチド、薬剤、天然あるいは合成化合物など、どのようなものであってもよい。

【0027】

具体的には、既に発明者らにより報告されたヒトRNase 1 (Jinno H, Ueda M, Ozawa S, Ikeda T, Enomoto K, Psarras K, Kitajima M, Yamada H, Seno M Life Sci. 1996;58(21):1901-8) またはRNase 3 (別名ECP: eosinophil cationic protein ; Mallorqui-Fernandez G, Pous J, Peracaula R, Aymami J, Maeda T, Tada H, Yamada H, Seno M, de Llorens R, Gomis-Ruth FX, Coll M; J Mol Biol. 2000 Jul 28;300(5):1297-307.) 等が適用される。

【0028】

これらのタンパク質は、細胞内外で作用し細胞傷害活性を有するものであるが、これらのRNaseを本発明の物質運搬体(薬剤)に内包させて運搬することにより、細胞外では無毒化する一方、細胞内だけで作用させることができるので、より副作用の少ない新しい癌治療方法として期待される。

【0029】

なお、上記細胞導入物質として、ほかに下記表1に示すタンパク質あるいは当該タンパク質をコードする遺伝子が挙げられ、さらに、癌疾患に有効なサイトカイン各種(インターフェロン各種、インターロイキン各種など)、癌抑制遺伝子(p53等)等の治療遺伝子も挙げることができる。

【0030】

【表 1】

RNase等の細胞質RNA を攻撃するタンパク質	Pancreatic type Rnases from vertebrates
	RNase 1 or Bovine RNase A
	Eosinophil derived neurotoxin
	Eosinophil cationic protein
	Liver RNase (RNase 4)
	Angiogenin
	Bovine seminal RNase
	Frog Rnases (Onconase etc.)
膜透過を妨げるタンパク質	Streptolysin(Streptococcus pyogenes)
	Cholesterol binding toxins (Streptococcus, Bacillus, Clostridium, Listeria)
	alpha-Toxin (Staphylococcus aureus)
	Delta-Toxin (Staphylococcus aureus) and melittin (Apis mellifera)
	Aerotysin (Aeromonas hydrophila)
	Escherichia coli hemolysin
シグナル伝達を妨げるタンパク質	Cholera toxin (Vibrio cholerae)
	Heat-labile enterotoxins (Escherichia ColiD)
	Pertussis toxin (Bordetella pertussis)
	Exoenzyme C3 (Clostridium botulinum)
	Adenylate cyclase toxin (Bordetella sp.)
	Anthrax edema factor (Bacillus anthracis)
タンパク質合成を妨げるタンパク質	Diphtheria toxin (Corynebacterium diphtheriae)
	Pseudomonas aeruginosa exotoxin A
	Shiga toxins (Shigella dysenteriae serotype 1, Escherichia Coli)
	Ricin (Ricinus communis)
	Ribosome-inactivating proteins
	alpha-Sarcin and related toxins (Aspergillus)
細胞骨格を攪乱するタンパク質	C2 toxin (Clostridium botulinum type C and D)
	Cytotoxic necrotizing factors (Escherichia coli)
	Enterotoxin A and cytotoxin B (Clostridium difficile)
	ActA (Listeria monocytogenes)
	IcsA (Shigella flexneri)
	Zonula occludens toxin (Vibrio cholerae)
免疫または炎症反応を抑えるタンパク質	Pyrogenic exotoxins (superantigens) (Staphylococcus aureus and Streptococcus pyogenes)
	Anthrax lethal toxin (Bacillus anthracis)
	Leukocidins and gamma lysins (Staphylococcus sp.)
	Tetanus neurotoxin (Clostridium tetani)
膜輸送を攪乱するタンパク質	VAMP-specific botulinum neurotoxins
	Botulinum neurotoxins type A and E (Clostridium botulinum)
	Botulinum neurotoxin type C (Clostridium botulinum)
	Vacuolating cytotoxin (Helicobacter pyloriD)

表1の続き

ナトリウムチャネル攪乱タンパク質	alpha-Scorpion toxins
	beta-Scorpion toxins
	Excitatory insect selective neurotoxins from scorpion venoms
	Depressant insect selective neurotoxins from scorpion venoms
	mu-Conotoxins (<i>Conus geographus</i>)
	mu-Agatoxins (<i>Agelenopsis aperta</i>)
	Anthopleurin-A, -B, and -C (anemone toxin)
	Anemone toxins (type II)
	Calitoxins
カリウムチャネル攪乱タンパク質	Kaliotoxin
	Scyllatoxin (<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>)
	Apamin (honey bee <i>Apis mellifera</i>)
	MCD peptide (honey bee <i>Apis mellifera</i>)
	Charybdotoxin and iberiotoxin (<i>Leiurus quinquestriatus</i> var. <i>hebraeus</i> and <i>Buthus tamulus</i>)
	margaritatus, <i>Centruroides noxius</i> , <i>Androctonus mauretanicus</i>)
	Dendrotoxins (<i>Dendroaspis</i> species)
	Sea anemone potassium channel toxins
カルシウムチャネル攪乱タンパク質	Omega-Conotoxins (<i>Conus</i> spp.)
	Omega-Agatoxins (<i>Agelenopsis aperta</i>)
	Omega-Grammotoxin SIA (<i>Grammostola spatulata</i> Chilean pink tarantula)
	Hololena toxin (<i>Hololena curta</i>)
	<i>Pardosa reurys tristis</i>)
	<i>Dendroaspis polylepis</i>)
	<i>Dendroaspis angusticeps</i>)
	beta-Lipidotoxin-h
	Taicatoxin (<i>Oxyuranus scutellatus scutellatus</i>)
アセチルコリン受容体攪乱タンパク質	alpha-Bungarotoxin (<i>Bungarus multicinctus</i>)
	alpha-Cobratoxin (<i>Naja kaouthia</i>)
	Erabutoxins (<i>Laticauda semifasciata</i>)
	Toxin alpha (' <i>Naja nigricollis</i> ')
	kappa-Bungarotoxin (<i>Bungarus multicinctus</i>)
	alpha-Conotoxins (<i>Conus</i> spp.)
	Snake toxins against muscarinic acetylcholine receptors
	Muscarinic toxin-1, -5, -7, m1-toxin from green mamba (<i>Dendroaspis angusticeps</i>)
	Muscarinic toxin-alpha, -beta from black mamba (<i>Dendroaspis polylepis</i>)
リアノジン受容体カルシウムイオンチャネル攪乱タンパク質	Helothermine (<i>Heloderma horridum horridum</i>)

表1の続き

シナプス前攪乱タンパク質	beta-Bungarotoxin (<i>Bungarus multicinctus</i>)
	Rattlesnake venom neurotoxins: crotoxin-related proteins
	Ammodytotoxins (<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>)
	Notexins (<i>Notechis scutatus scutatus</i>)
	Textilotoxin (<i>Pseudonaja textilis textilis</i>)
	Tai poxin
	alpha-Latrotoxin (black widow spider)
	ecinguttatus)
	Pardaxin (<i>Pardachirus marmoratus</i>)
グルタミン酸受容体攪乱タンパク質	Palytoxin (Corals of the spp. <i>Palythoa</i>)
	Equinatoxins (<i>Actinia equina</i> L., sea anemone)
	Conantokins (<i>Conus</i> spp.)

【0031】

また、これらの細胞導入物質を上記の中空ナノ粒子に導入する方法としては、通常の化学的、分子生物学的実験手法で用いられる様々な方法が適用される。たとえば、エレクトロポレーション法、超音波法、単純拡散法、あるいは電荷を有する脂質を用いる方法等が好ましく例示される。

【0032】

そして、これらのタンパク質中空ナノ粒子、あるいは物質運搬体を用いて、*in vivo*あるいは*in vitro*で細胞、または組織に特異的に物質を導入することが可能となる。さらには、上記のRNaseを用いた例のように、以上のとおりのタンパク質中空ナノ粒子や物質運搬体を用いて、特定細胞または組織に物質を導入することを各種疾患の治療法あるいは治療法の1ステップとして行うことも可能になるのである。

【0033】

本発明の薬剤による治療効果については、後述の実施例に示すとおり、動物実験により実際に確認された。この実施例では、ヒト扁平上皮癌由来の細胞を移植したヌードマウスに、単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ (HSV1 tk) 遺伝子を包含した本発明の薬剤を投与し、さらにガンシクロビル (ganciclovir: GCV) を投与した後、移植した癌組織の大きさを観察することにより治療効果を確認した。薬剤の投与は静脈内投与により行ったが、投与方法としては、このほかに、経口投与、筋肉内投与、腹腔内投与、皮下投与等が挙げられる。

【0034】

以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさ

らに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

【0035】

【実施例】

以下の実施例において、HBsAgとは、B型肝炎ウイルス表面抗原 (Hepatitis B virus surface Antigen) を示す。HBsAgは、HBVの外被タンパク質であり、図1の模式図に示すように、HBsAgには、Sタンパク質、Mタンパク質、Lタンパク質の3種類がある。このうち、Sタンパク質は、3種のタンパク質に共通した、重要な外被タンパク質であり、Mタンパク質は、Sタンパク質のN末端側に55アミノ酸 (pre-S2 peptide) が付加したものである。また、Lタンパク質は、Mタンパク質のN末端側に、108もしくは119アミノ酸 (pre-S1 peptide) が付加したものである。

【0036】

HBsAg Lタンパク質のPre-S領域 (pre-S1, pre-S2) は、HBVが肝細胞に結合する際に、それぞれ重要な役割を担うことが知られている。Pre-S1は、肝細胞に直接結合する部位を持ち、pre-S2は、血中の重合アルブミンを介して肝細胞に結合する重合アルブミンレセプターを有するのである。

【0037】

真核細胞でHBsAgを発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積される。HBsAgのLタンパク質は、分子間で凝集を起こし、小胞体膜を取り込みながら、出芽様式でルーメン側に粒子として放出される。

【0038】

以下の実施例では、HBsAgのLタンパク質を用いた。また、図2に以下の実施例に記載されるHBsAg粒子の発現および精製操作の概略説明図を示した。

【0039】

(実施例A) 遺伝子組換え酵母によるHBsAg粒子の発現

本発明者らによって報告されたJ.Biol.Chem., Vol.267, No.3, 1953-1961, 19

92記載の方法に基づいて、pGLDLIP39-RcTを保持した遺伝子組換え酵母 (*Saccharomyces Cerevisiae* AH22R⁻株) を、合成培地High-Piおよび8S5N-P400中で培養し、HBsAg Lタンパク質粒子を発現させた。(図2a~c)

定常成長期(約72時間後)にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical Co.製)を用いて、whole cell extractを準備し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を用いて分離して、銀染色によって試料中のHBsAgの同定を行った。

【0040】

これより、HBsAgは分子量約52kDaのタンパク質であることが明らかとなった。

【0041】

(実施例B) HBsAg粒子の遺伝子組換え酵母からの精製

(1) 合成培地8S5N-P400で培養された遺伝子組換え酵母(湿重量26g)をbuffer A溶液(7.5M 尿素、0.1M リン酸ナトリウム、pH7.2、15mM EDTA、2mM PMSF、0.1% Tween 80)100mlに懸濁し、ガラスビーズを用いてビードビーター(BEAD-BEATER)にて酵母を破碎した。破碎後、上清を遠心分離により回収した。(図2d)

(2) 次に、上清を0.75倍容の33%(w/w)PEG6000と混合し、30分間氷冷した。その後、遠心分離(7000rpm、30分間)を行い、ペレットを回収した。同ペレットは、Tween 80を含まないbuffer A溶液中で再懸濁した。

【0042】

(3) 再懸濁した液を、10~40%の勾配をかけたCsClに重層し、28000rpm、16時間の超遠心分離を行った。遠心分離後の試料を12画分に分け、ウェスタンブロット法(Western Blotting)(1次抗体は、anti-HBsAgモノクローナル抗体)によりHBsAgを含む画分を同定した。さらに、HBsAgを含む画分をTween 80を含まないbuffer A溶液で透析した。

【0043】

(4) (3) で得られた透析液 (12 ml) を 5 ~ 50 % の勾配をかけたショ糖に重層し、28000 rpm、16 時間の超遠心分離を行った。遠心分離後、

(3) と同様に、HBsAg を含む画分を同定し、HBsAg を含む画分を尿素と Tween 80 は含まず、代わりに 0.85 % の NaCl を含む buffer A 溶液で透析した。((2) ~ (4) : 図 2 e)

(5) (4) と同様の操作を繰り返し、透析後の試料をウルトラフィルター (Ultra Filter) Q2000 (アドバンテック社製) を用いて濃縮し、使用する時まで 4℃ にて冷蔵保存した。(図 2 f)

CsCl 平衡遠心分離後のウェスタンブロット (3) の結果から、HBsAg は、分子量 52 kDa で S 抗原性を有するタンパク質であることが分かった。最終的に、培地 2.5 L 由来、湿重量 26 g の菌体から、約 24 mg の精製 HBsAg 粒子を得た。

【0044】

一連の精製過程における画分を銀染色 SDS-PAGE で解析した。また、精製により酵母由来のプロテアーゼが除去されていることを確認するために、(5) で得られた HBsAg 粒子を 37℃ で 12 時間インキュベートした後、SDS-PAGE を行い、銀染色により同定を行った。

【0045】

その結果、酵母由来のプロテアーゼは、一連の精製過程において完全に除去されていることが確認された。

【0046】

(実施例 C) 生体認識分子提示用汎用型 HBsAg 粒子 (HBsAg-Nu11 粒子) の作製

HBsAg 粒子はヒト肝細胞特異的に感染することができるが、その高い感染性を担う同粒子表面に提示されている肝細胞認識部位は、pre-S1 領域の 3 から 7 アミノ酸残基に含まれていることが判明している (Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, Guguen-Guillouzo C, Gripon P., J. Virol. 1999, Mar; 73(3): 205 2-7)。

【0047】

ここでは、HBsAg粒子の粒子形成能を保ちながら、肝細胞に対する高い感染能を欠失し、かつ任意の生体認識分子を粒子表面に提示することができる改変HBsAg粒子（以下「HBsAg-Null粒子」という）の作製法を記す。

【0048】

実施例Aに記載されたpGLDLIIP39-RcTプラスミドのヒト肝細胞認識部位をコードする遺伝子領域を欠失させ、同時に制限酵素NotIサイト（gcggccgc）を挿入するために、配列番号1のオリゴヌクレオチドと配列番号2のオリゴヌクレオチドをPCR用プライマーとして使用して、QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit（Stratagene社）を用いたPCR法をpGLDLIIP39-RcTプラスミドに対して行った。

【0049】

具体的には、耐熱性DNAポリメラーゼとしてPfu DNA polymerase（Stratagene）を用い、PCRスケジュールは、95℃30秒間の変性、55℃1分間のアニーリング、68℃9分間の合成反応を30回繰り返した。その後、PCR産物を制限酵素NotIで消化し、大腸菌DH5αに形質転換し、出現コロニーからベクターDNAを抽出し、塩基配列から変異導入されたpGLDLIIP39-RcTプラスミドを選抜した。（以下、「pGLDLIIP39-RcT（null）」という）。

【0050】

実施例A記載の方法で、pGLDLIIP39-RcT（null）プラスミドを形質転換し、合成培地High-Pi及び8S5N-P400中で培養し、HBsAg-Null粒子を発現させた。

【0051】

定常成長期（培養開始から72時間後）にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent（Pierce Chemical社製）を用いて菌体粗抽出液を作製し、SDS-PAGEを用いて分離し、銀染色並びに抗Sモノクローナル抗体（フナコシ社）を用いるWestern法によりHBsAg-Nullの同定を行った。

【0052】

これより、HBsAg-Nu11は分子量約42kDaのタンパク質であることが明らかになった。

【0053】

さらに、実施例Bに記載の方法に従って、培地2.5L由来の上記菌体（約26g）から、約3mgの精製HBsAg-Nu11粒子を得た。HBsAgの粒子構造のみを検出することができるAuszyme II EIAキット（ダイナボット社）を用いて、HBsAg粒子及びHBsAg-Nu11粒子のS抗原性（HBsAgの粒子化度合い）を測定したところ、両者とも同等の値が観察された。

【0054】

（実施例D） 上皮成長因子（EGF：Epidermal Growth Factor）提示型HBsAg粒子（HBsAg-EGF粒子）の作製

EGF受容体は極めて多くの細胞が細胞表層に発現していることが知られており、特にある種の癌（食道癌、大腸癌等）の増悪に関係していることが分かっている。そこで、EGF受容体を標的とするHBsAg粒子を作製すれば、EGF受容体を発現する癌組織に対する有効な治療手段になると考えられる。

【0055】

ここでは、実施例C記載の方法によるHBsAg-Nu11粒子を基にした、EGF提示型HBsAg粒子（HBsAg-EGF粒子）の作製法を記す。

【0056】

ヒト由来EGF前駆体cDNA断片（Bell GI, Fong NM, Stempien MM, Wormsted MA, Caput D, Ku LL, Urdea MS, Rall LB, Sanchez-Pescador R Nucleic Acids Res 1986 Nov 11;14(21):8427-46）を鋳型として、成熟型ヒトEGF領域（53アミノ酸残基）をコードする遺伝子断片をPCR法により常法どおり増幅した。

【0057】

用いた2種類のPCRプライマーは、センス側が配列番号3のオリゴヌクレオチド、アンチセンス側が配列番号4のオリゴヌクレオチドで、両方とも5'末端側に制限酵素NotIサイト（gcggccgc）を有するように設計した。

【0058】

PCR産物をアガロース電気泳動で分離した後、目的のcDNAを含むバンド（約170bp）を回収し、TOPO TA Cloning kit（Invitrogen社）を用いてpCR 2.1-TOPOベクター（Invitrogen社）にサブクローニングした。塩基配列を確認した後、制限酵素NotIで切断して、約170bpの目的DNA断片を回収し、pGLDLIIP39-RcT（null）を制限酵素NotIで開裂させたものとTaKaRa Ligation kit ver.2（TaKaRa社）を用いて閉環結合させ、大腸菌DH5 α を形質転換した。

【0059】

塩基配列解析により選抜を行い、挿入したEGF遺伝子がHBsAg遺伝子と読み取り枠が一致して融合したものを選抜し、プラスミドをpGLDLIIP39-RcT-EGFと命名した。

【0060】

実施例Aの方法に基づいて、pGLDLIIP39-RcT-EGFプラスミドを形質転換し、合成培地High-Pi及び8S5N-P400中で培養して、HBsAg-EGF粒子を発現させた。

【0061】

定常成長期（培養開始から72時間後）にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent（Pierce Chemical社製）を用いて、菌体粗抽出液を作製し、SDS-PAGEを用いて分離して、銀染色並びに抗ヒトEGFポリクローナル抗体（Santa Cruz社）を用いるWestern法によりHBsAg-EGFの同定を行った。

【0062】

これより、HBsAg-EGFは分子量約50kDaのタンパク質であることが明らかになった。

【0063】

実施例Bに記載の方法に従って、培地2.5L由来の上記菌体（約26g）から、約3mgの精製HBsAg-EGF粒子を得た。HBsAgの粒子構造のみを検出することができるAuszyme II EIAキット（ダイナボット社）を用いて、HBsAg粒子およびHBsAg-EGF粒子のS抗原性（HBsAgの粒子化度

合い)を測定したところ、両者とも同等の値が観察された。

【0064】

したがって、HBsAg-EGF粒子がHBsAg粒子と同様に得られていることが示された。

【0065】

(実施例E) HBsAg-EGF粒子へのHSV1 tk遺伝子の封入(HSV1 tk遺伝子を包含したHBsAg-EGF粒子の製造)

次に、上記方法により作製したHBsAg-EGF粒子内へ、癌治療用遺伝子として単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ(HSV1 tk)遺伝子を封入し、本発明の薬剤としてのHSV1 tk遺伝子を包含したkHBsAg-EGF粒子を製造した。

【0066】

上記HSV1 tk遺伝子が導入された癌細胞では、このHSV1 tk遺伝子が発現することによりガンシクロビル(ganciclovir)に対して感受性になり、ガンシクロビルが投与されると、強力な毒性を惹起しつつ、癌細胞は死滅する。このように、HSV1 tk遺伝子は、癌遺伝子治療に広く使用される遺伝子の1つである。

【0067】

本実施例では、HBsAg-EGF粒子内へHSV1 tk遺伝子を封入するため、HSV1 tk遺伝子を発現するInvivogen社製のベクターpGT65-hIFN- α を使用し、この発現ベクターをエレクトロポレーション法によりHBsAg粒子内に導入することによって、HBsAg-EGF粒子内にHSV1 tk遺伝子が包含された粒子を作製した。具体的には、HBsAg-EGF粒子中のLタンパク質粒子50 μ gに対し、上記発現ベクター10 μ g導入した。またこのとき、PBSバッファーを使用し、エレクトロポレーションの条件は、220V、950 μ Fで4mmのキューベットを使用して行った。

【0068】

(実施例F) ヒト扁平上皮癌を移植したヌードラットに対するHSV1 tk遺伝子を包含したHBsAg-EGF粒子による癌治療効果

次に、上記方法により作製したHSV1 tk遺伝子を包含したHBsAg-E GF粒子のヒト扁平上皮癌に対する治療効果を実験動物により確認した。

【0069】

本実施例では、実験動物として日本クレアから購入したヌードラット（系統：F344/NJcl-rnu/rnu、性別：メス）を使用して担癌ラットを作製し、治療効果を確認した。担癌ラットは以下の方法により作製した。まず、ヒト腫瘍株（ヒト肝臓癌由来細胞HuH-7（JCRB0403）、および陰性対照としてヒト大腸癌由来細胞WiDr（ATCC CCL-218））を培養し、通常の方法で集細胞して得た 1×10^6 細胞を、HBBS（HanksBBS；血清なし）と懸濁し、氷中保存した。細胞と等量のベクトン&ディッキンソン社製のMatrigel（40234C）を、得られた懸濁液と混合し、使用説明書どおりに使用して、ヌードラットに腫瘍を生着させた。そして、生着させた腫瘍が直径2～3cm程度の固形癌になるまで約3週間生育させて、担癌ラットを得た。

【0070】

その後、上記担癌ラットに、HSV1 tk遺伝子を包含したHBsAg-E GF粒子 $10 \mu\text{g}$ （この量はHBsAg-E GF粒子（この粒子は80%のタンパク質、10%の糖鎖、10%のリン脂質からなる）のタンパク質量を意味する）を尾静脈より投与した（静脈注射した）。そして、静脈注射の5日後から、上記担癌ラットに対し、浸透圧ポンプ（alzet osmotic pump; Cat番号2ML2）を用いてガンシクロビル（GCV）を 50 mg/kg/day の割合で投与した。上記浸透圧ポンプは、GCVを含む薬液とともに上記担癌ラットの背中皮下に移植した。このガンシクロビルの投与は、最大14日間行った。ガンシクロビル投与後、上記担癌ラットの腫瘍組織の状態（大きさ）を経時的に観察した。具体的には、ノギスで腫瘍部分の短径と長径とを測定し、腫瘍容積近似式（長径 \times 短径 \times 短径 $\div 2$ ）を計算して行った。測定は、全てネズミ3連で行った。その結果を下記の表2および図3に示す。

【0071】

【表 2】

		G C V 投与後の日数						
		0	1	3	6	9	1 2	1 5
腫瘍の大きさ	A 4 3 1	100	101	98	92	85	79	69
(%)	N U E	100	101	106	111	116	125	131

【0072】

表 2 および図 3 に示すように、ヒト肝臓癌由来の腫瘍組織（N U E）では経時的な退縮は観察されず、治療効果は認められなかったのに対して、ヒト扁平上皮癌由来の腫瘍組織（A 4 3 1）では経時的な退縮が観察され、H S V 1 tk 遺伝子を包含した H B s A g - E G F 粒子によるヒト扁平上皮癌特異的な治療効果が認められた。

【0073】

また、対照実験として、E G F 等の増殖因子を提示していない前記の H B s A g - N u 1 1 粒子（上記 H S V 1 tk 遺伝子を包含したもの）を同じヌードラットに投与したところ、ランダムに遺伝子が導入されてしまい、扁平上皮癌特異的な治療効果および肝癌特異的な治療効果ともに認められなかった。

【0074】

このように、本発明に係る薬剤としての上記 H S V 1 tk 遺伝子を包含した H B s A g - E G F 粒子は、ヒト扁平上皮細胞に対して極めて高い特異性と効率で遺伝子導入が可能であり、扁平上皮癌に対して実際に治療効果があることが確認された。また、本実験により、本発明の薬剤による扁平上皮癌等の疾患治療のためのプロトコールを実験動物で確立することができた。

【0075】

【発明の効果】

以上のように、本発明に係る薬剤は、静脈注射という簡便な方法で、特定の細胞または組織における疾患を特異的かつ効果的に治療することができ、従来の遺伝子治療と大きく異なり、外科手術を必要とせず、副作用の心配もきわめて低く、そのまま臨床応用可能なものである。

【 0 0 7 6 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Growth factors (or the like) presented protein hollow nano-particles for therapeutic drug

<130> P023P02

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligonucleotide

<400> 1

cgacaaggca tgggaggcgg ccgcagccct caggctcag

39

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligonucleotide

<400> 2

ctgagcctga gggctgcggc cgcctcccat gccttgtcg

39

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligonucleotide

<400> 3

ggggcggccg catgaactct gattccg

27

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligonucleotide

<400> 4

gggCggccgc cacgcagttc ccaccatttc

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の実施例における H B s A g 遺伝子の各タンパク質領域を表す概略模式図である。1～8は、表面抗原における各部位の働きを示している。

【図 2】

本発明の実施例における遺伝子組換え酵母を用いた H B s A g 粒子の発現および精製操作を例示した概略説明図である。(a) 遺伝子組換え酵母の作製、(b) H i g h - P i 培地における培養、(c) 8 S 5 N - P 4 0 0 培地における培養、(d) 破碎、(e) 密度勾配遠心分離、(f) H B s A g 粒子。

【図 3】

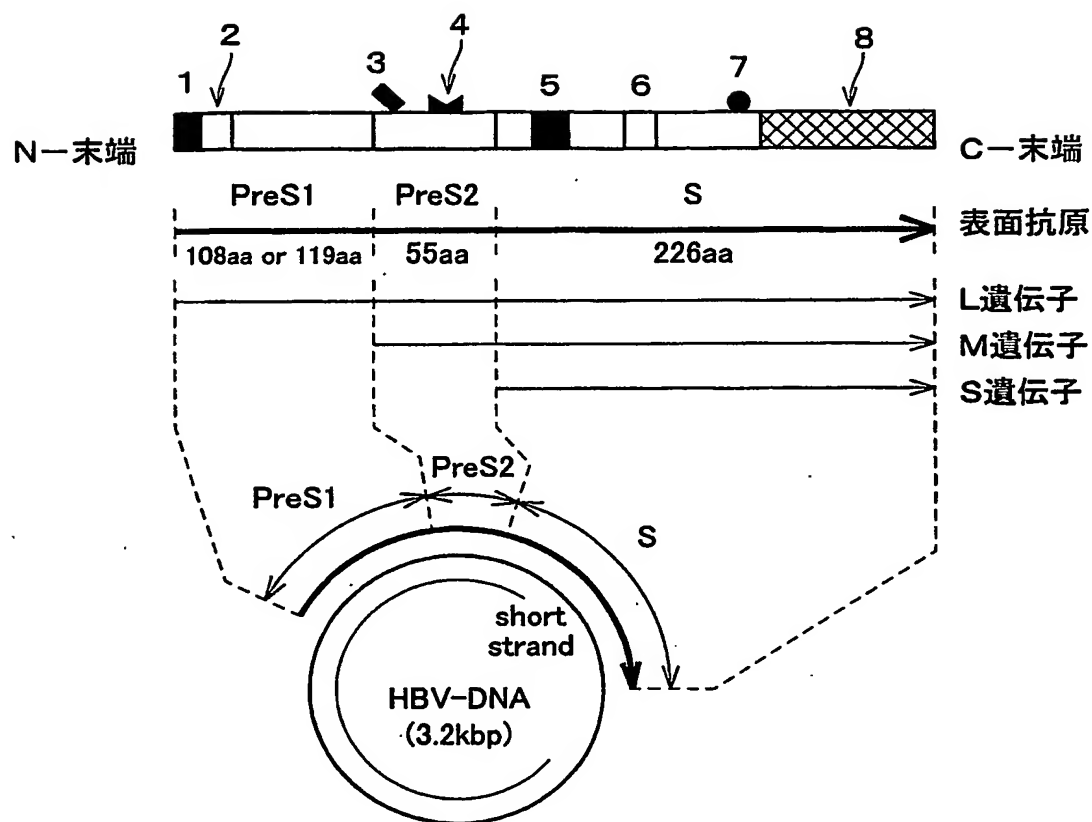
本発明に係る薬剤について、実験動物で行った治療効果を示すグラフである。

【符号の説明】

- 1 粒子形成抑制部位
- 2 直接的なヒト肝細胞特異的レセプター
- 3 糖鎖 1
- 4 間接的なヒト肝細胞特異的レセプター（重合ヒト血清アルブミンレセ
プター）
- 5 膜貫通領域 1
- 6 膜貫通領域 2
- 7 糖鎖 2
- 8 膜貫通領域 3

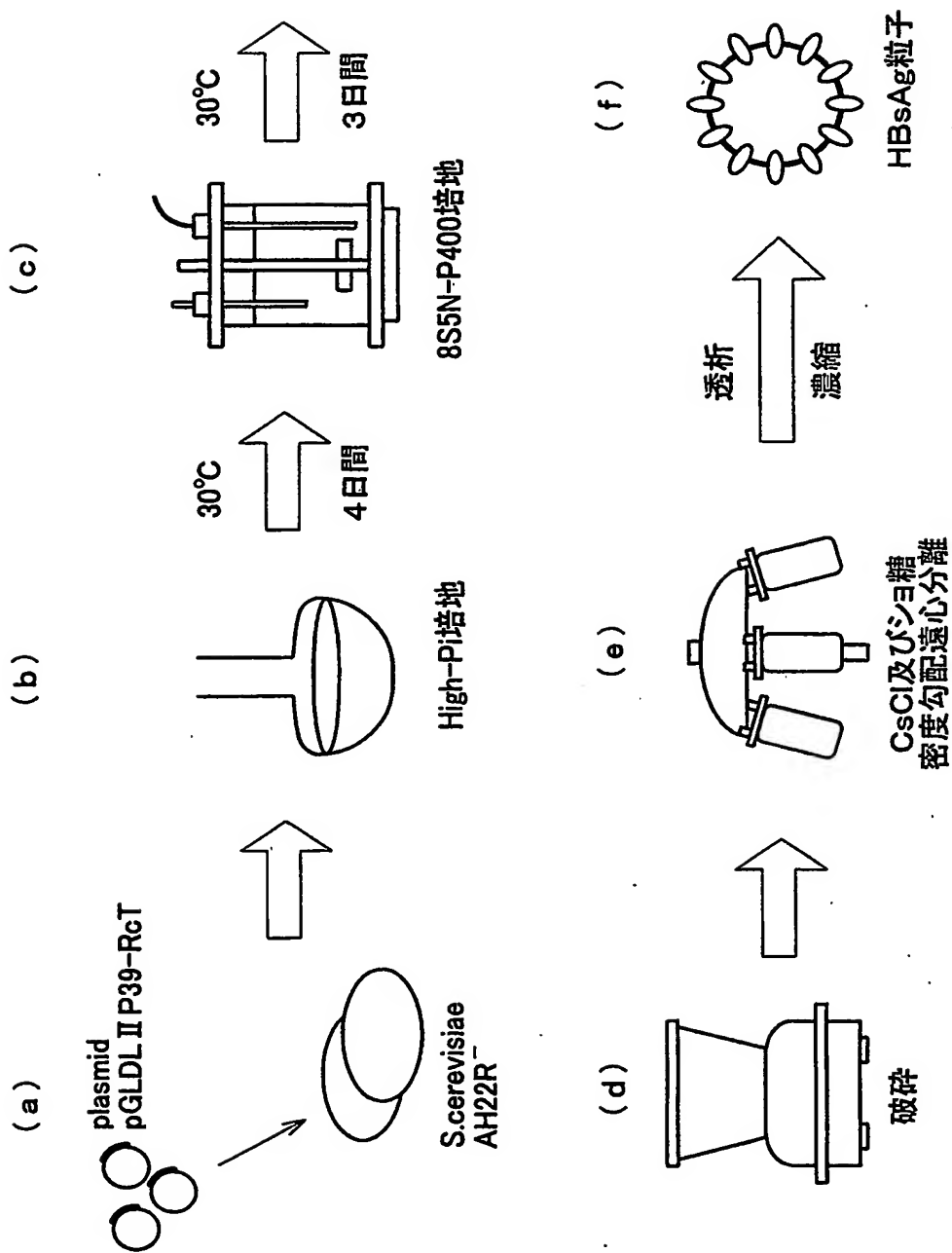
【書類名】 図面

【図1】

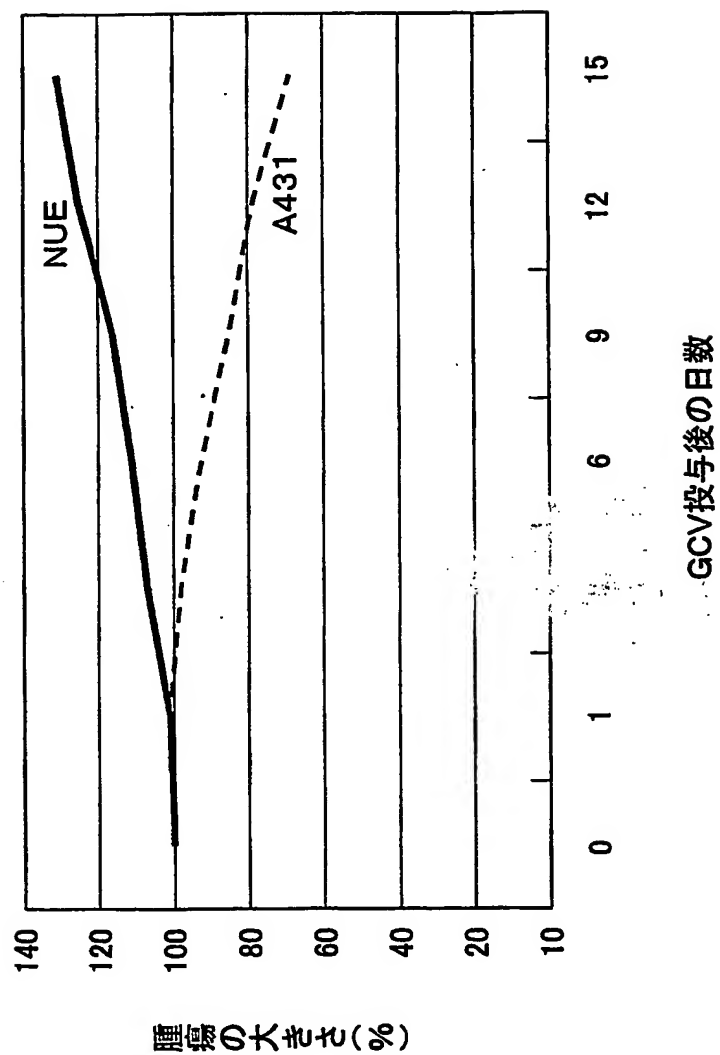


- 1 粒子形成抑制部位
- 2 直接的なヒト肝細胞特異的レセプター
- 3 糖鎖1
- 4 間接的なヒト肝細胞特異的レセプター
(重合ヒト血清アルブミンレセプター)
- 5 膜貫通領域1
- 6 膜貫通領域2
- 7 糖鎖2
- 8 膜貫通領域3

【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 タンパク質中空ナノ粒子を用いる特定の細胞または組織に特異的に作用する疾患治療用薬剤であって、動物実験により実際に治療効果が認められた薬剤、およびこの薬剤を用いる治療方法を提供する。

【解決手段】 増殖因子などが提示され、粒子形成能を有するタンパク質（たとえば、本来の肝細胞に対する感染能を欠失するように改変され、さらに増殖因子等を提示するように改変されたB型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質）からなる中空ナノ粒子に、疾患治療用の細胞導入物質（たとえば、癌治療用遺伝子である単純ヘルペスウィルス由来チミジンキナーゼ遺伝子）が包含されてなる薬剤である。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団